

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

 **BLACK BORDERS**

- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**

THIS PAGE BLANK (USPTO)

-2-

A61K9/127P Verantwortschaftsnummer:

0 338 971



Office européen des brevets

A1

②

## EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

② Anmeldenummer: 89730103.2

② Int. Cl. 4: A 61 K 9/50

② Anmeldetag: 13.04.89

A 61 K 47/00

③ Priorität: 16.04.88 DE 3812816

③ Anmelder: SCHERING AKTIENGESELLSCHAFT Berlin-

③ Veröffentlichungstag der Anmeldung:  
25.10.89 Patentblatt 89/43

und Bergkamen  
Müllerstrasse 170/178 Postfach 65 03 11

D-1000 Berlin 65 (DE)

③ Benannte Vertragsstaaten:  
AT BE CH DE ES FR GB GR IT LI LU NL SE

③ Erfinder: Lawaczeck, Rüdiger, Dr.  
Beyschlagstrasse 8c  
D-1000 Berlin 27 (DE)

④ Verfahren zur Herstellung von Liposomen und/oder biologischer Zellen, die Inhaltsstoffe eingeschlossen haben, sowie deren Verwendung.

④ Zur Inkorporation, Addition und/oder Substitution von Substanzen in Liposomen oder Zellen werden Inertgase, die mit steigendem Druck zu einer Verminderung der Lipidordnung führen, von hinreichend hohem Druck im gasförmigen und/oder verflüssigten Zustand verwendet. Die beladenen Liposomen oder Zellen sind als Pharmakaträger geeignet.

## Beschreibung

## Verfahren zur Herstellung von Liposomen und/oder biologischer Zellen, die Inhaltsstoffe eingeschlossen haben, sowie deren Verwendung

Die Erfindung betrifft den in den Patentansprüchen genannten Gegenstand, d.h. ein Verfahren zur Herstellung von Liposomen und/oder biologischer Zellen, die während der Herstellung extern zugesetzte Substanzen aufnehmen. In beiden Fällen erfolgt die Substanzaufnahme unter schonenden Bedingungen. Die beladenen Liposomen und/oder Zellen sind als zielgerichtete Pharmakaträger geeignet.

Liposomen sind aus Lipidmolekülen, vorzugsweise Phospholipiden, aufgebaut. Diese bilden im wässrigen Medium spontan Lipiddoppelschichten aus, die geschlossen und lamellenartig angeordnet sind. Eine oder mehrere Lamellen trennen das innere Kompartiment von der äußeren Lösung. Die polaren hydrophilen Kopfgruppen der Lipide (z.B. Ethanolamin beim Cephalin, Cholin beim Lecithin) zeigen zur Wasserphase hin, die unpolaren hydrophoben Fettsäurereste sind ins Innere der Lipiddoppelschicht gerichtet. Die Doppelschichten sind zwei Moleküllagen oder 4 bis 5 nm dick. Man unterscheidet die Liposomen nach ihrer Größe und Anzahl der Lamellen und spricht von kleinen, unilamellaren (small unilamellar vesicles (SUV)) mit Radien bis zu 100 nm, großen unilamellaren (large unilamellar vesicles (LUV)) mit Radien größer als 100 nm sowie multilamellaren Liposomen (multilamellar vesicles (MLV)). In wässriger Phase lagern sich Phospholipide ohne Zutun zu multilamellaren Liposomen zusammen, bei denen zwiebelartig mehrere Lipiddoppelschichten durch Wasserschichten getrennt angeordnet sind.

Die Ausbildung lamellar angeordneter Lipiddoppelschichten ist eine Folge der Balance physikalischer Kräfte und sterischer Effekte. Die Lipiddoppelschicht bildet auch den Bildungsblock der Plasmamembranen, die biologische Zellen umhüllen und bei denen als zweiter Baustein Proteine in die Lipidmatrix eingelagert sind.

Die physikalischen und physiologischen Eigenschaften von Liposomen sind durch deren Lipidzusammensetzung, Größe, Temperatur, pH, Art und Stärke des Puffers, Herstellungsbedingungen, Historie und Alter bestimmt. Die Verwendung von Liposomen, die mit Arzneimitteln beladen wurden, hat in der Diagnostik und Therapie großes Interesse gefunden. Liposomen eröffnen als zielgerichtete Träger von Pharmaka neue Diagnose- und Therapieformen (s. z.B. R. Lawaczeck "Liposomen als zielgerichtete Pharmakaträger", Deutsche Apotheker Zeitung 127, 1771-1773 (1987), M.J. Ostro "Liposomes", Sci. Am. 258, 90-99 (1987)). Für pharmazeutische Zwecke sind die Permeabilität der Lipidmembran und die Stabilität der Liposomen von Interesse; physiologisch ist zudem die Fusogenität und die Kinetik der Zellaufnahme wichtig.

Aufgrund des breiten Interesses gibt es eine Vielzahl von Veröffentlichungen, die sich mit der Physik, Chemie, Biologie, Herstellung und Verwendung von Liposomen befassen. Ein kürzlich erschien-

ner Übersichtsartikel mit pharmazeutischer Ausrichtung wurde von D. Lichtenberg und Y. Barenholz ("Liposomes: preparation, characterization, and preservation" in *Methods of Biochemical Analysis* Vol. 33, 337-462 (1988)) publiziert. Die Verwendung von Zellen als Pharmakaträger wurde u.a. von C. Nicolau und Mitarbeitern beschrieben ("Resealed red blood cells as a new blood transfusion product", *Bibliotheca haemat.* 51, 82-91 (1985)).

Zur Herstellung uni- und oligolamellarer sowie beladener Liposomen wurden verschiedene Strategien entwickelt (referiert bei Lichtenberg & Barenholz), die schematisch klassifiziert werden können als 1. physikalische Zerschlagung durch Scherkräfte und 2. chemische Desintegration durch "Heilermoleküle" der sich spontan bildenden multilamellaren Liposomen. Die Anwendung von Scherkräften ist beim Einschluß labiler Substanzen nicht geeignet. Heilermoleküle stehen in Form von Detergentien oder organischer Lösungsmittelmoleküle zur Verfügung. Mit deren Hilfe werden Nicht-Doppelschicht-Aggregate der Lipidmoleküle (meist Mizellen) ausgebildet. Das Entfernen der Heilermoleküle führt wieder zu den sich spontan bildenden liposomalen Doppelschichten und zur gleichzeitigen Aufnahme zugesetzter Substanzen. Die vollständige Entfernung der Detergentmoleküle ist oft schwierig, zudem kann bei proteinhaltigen Einschlußmolekülen eine ungewünschte Denaturierung hinderlich sein. Die Aufnahme durch biologische Zellen kann durch hypo-osmolares Aufbrechen (Lyse) der Zellen mit nachfolgender Einstellung der Isotonie oder durch elektrisch induzierte Porenbildung erreicht werden. Dabei werden extern vorhandene Substanzen aufgenommen und während des Verschließens der Membran verkapst. Eine schonende Lyse unter isotonen, detergenz- und spannungsfreien Bedingungen ist bisher nicht bekannt. Es besteht demnach ein Bedarf an einem Herstellungsverfahren für inhaltsstoffe-enthaltende Liposomen und/oder biologische Zellen, das die obengenannten Nachteile nicht aufweist. Diese Aufgabe wird durch die vorliegende Erfindung gelöst.

Es wurde nun gefunden, daß eine liposomale und/oder zelluläre Aufnahme von Substanzen, vorzugsweise Pharmaka für therapeutische und diagnostische Zwecke, überraschenderweise auch durch die Anwendung gasförmiger Heilermoleküle erreicht werden kann. Dieses Verfahren weist nicht die Mängel der oben skizzierten Herstellungsverfahren auf. Bei diesem neuen Verfahren wird die wässrige Lipid- oder Zellsuspension, die neben den Lipiden oder Zellen die einzuschließende Substanz enthält, erfindungsgemäß mit einem Gas versetzt. Es kommen Gase mit "detergenzähnlichem Effekt" in Frage, d.h. Gase, die im Gegensatz zum hydrostatischen Druck die Ordnung der Lipidmoleküle mit steigendem Druck erniedrigen und/oder zu einer Solubilisierung der Membran führen. Es wird bei dem jeweils angewendeten Druck die Einstellung des

thermodynamischen Gleichgewichts mit der wärmigen Lipid- oder Zeissuspension abgewartet. Die verwendeten Gase müssen chemisch hinsichtlich der Lipide und der Wasserphase inert sein und nicht wie Kohlendioxid oder Ammoniak eine Wechselwirkung mit Wasser eingehen. Vorzugsweise kommt die Verwendung leicht handhabbarer, technisch zur Verfügung stehender Gase, die keinen toxischen Rückstand hinterlassen in einem Druckbereich bis zu 1000 bar, vorzugsweise bis zu 200 bar in Frage. Ein Überschreiten der Sieckurve im p, T-Diagramm in den flüssigen Zustand kann vorteilhaft sein. Geeignete Gase sind vorzugsweise Lachgas ( $N_2O$ ), Halothan, Argon, Xenon, Schwefelhexafluorid ( $SF_6$ ), Alkane wie Methan, Ethan, Propan, Butan, Hexan, Heptan, Alkene wie Ethen, Propen, Buten, Hexen, Hepten. Bei Lachgas wird ein Druck bis 55 bar gewählt, wie er in technischen Druckflaschen zur Verfügung steht. Für die Temperatur steht der Bereich zwischen dem jeweiligen Gefrier- und Siebpunkt zur Verfügung, vorzugsweise 0° bis 37° C. Die genannten Gasmoleküle üben einen "detergentzähnlichen" Effekt aus und führen zu einer Öffnung und/oder Schließung der Lipiddoppelschicht und/oder Membran. Während der Entspannungsschase bilden sich spontan neue Liposomen aus bzw. verschließen die Membranen wieder, so daß die zugesetzten Substanzen aufgenommen sind. Dieser Prozeß kann zyklisch wiederholt werden. Bei Liposomen ist eine Einengung der Liposomengröße über eine Druckentspannung auf Atmosphärendruck durch größenselektive Trennfilter möglich. Die Lipidzusammensetzung der Liposomen kann je nach therapeutischem und/oder diagnostischen Nutzen und nach dem Zielort optimiert werden. Bei den biologischen Zellen kommen neben den Zellen der Blutbahn wie Erythrocyten, Leukocyten, Lymphocyten und Thrombocyten vorzugsweise Zellen, die in Kultur gehalten werden, in Frage.

Die Vorteile der Liposomenherstellung und Zellbeladung mit dem "Gasheffer-Verfahren" liegen auf der Hand:

Das Verfahren ist technisch leicht zu realisieren und kostengünstig.

Die Gasmoleküle werden im Gegensatz zu den herkömmlichen Detergentmolekülen leicht entfernt. Wegen des inerten Charakters und der nur in Spuren zurückbleibenden Mengen spielt die Toxizität der verwendeten Moleküle - wenn überhaupt - eine untergeordnete Rolle.

Vorteilhaft ist das Arbeiten bei physiologischen Temperaturen oder darunter.

Die Anwendung der Inertgase in dem genannten Druckbereich ist nicht schädigend für die meisten Substanzen oder Zellen.

Das Verfahren ist zur liposomalen und zellulären Adsorption, Inkorporation und/oder Substitution hydro- und lipophiler Substanzen geeignet.

Die beladenen Liposomen können oberflächenmodifiziert und als zell- oder organspezifische Pharmakaträger oder Pharmakaspeicher verwendet werden.

### Beispiele

Beispiel 1: 20 mg Dimyristoyl-Lecithin werden in 1 ml Chlороform aufgenommen. Die Lösung wird in das Druckgefäß gegeben. Das Chlороform wird mit Lachsgemütsatz und nachfolgend unter Vakuum abgedampft. 2 ml Wasser enthaltend 1 mM Carboxyfluorescein (gereinigt und aus Ethanol umkristallisiert), 20 mM Tris HCl auf pH 8 eingestellt, werden eingefüllt.  $CO_2$  und  $C_2$  werden durch Spülen mit Lachgas ausgetrieben. Das Druckgefäß wird verschlossen und ein Lachgasdruck von 50 bar bei Raumtemperatur angelegt. Die Lösung wird 0,5 Stunden geschüttelt, danach wird langsam und isotherm auf Atmosphärendruck entspannt. Der Vorgang wird 5 mal wiederholt. Die Lösung wird aus dem Druckgefäß genommen und zur Entfernung des extern vorhandenen Carboxyfluoresceins über einen Anionenaustauscher gegeben. Die Liposomenfraktion enthält den eingeschlossenen Farbstoff und kann für Fluoreszenzstudien eingesetzt werden.

Beispiel 2: wie Beispiel 1, anstelle von Dimyristoyl-Lecithin werden 200 mg einer 4:1 Mischung aus Eigelblecithin und Cholesterin genommen. Carboxyfluorescein wird durch 20 mM Gadolinium-DTPA als MR-Kontrastmittel ersetzt. Die erhaltenen Liposomen können in der MR-Diagnostik eingesetzt werden.

Beispiel 3: Herstellung von Erythrocyten oder Erythrocyten-Ghosts, die mit Carboxyfluorescein beladen sind, unter isotonen Bedingungen. Frisches Rinderblut wird 3 mal in PBS Puffer pH 7,4 gewaschen und bis auf die Erythrocyten von anderen Bestandteilen befreit. Die dunkelrote, trübe Erythrocytensuspension wird mit PBS Puffer, der Carboxyfluorescein enthält, verdünnt, so daß die Konzentration des Carboxyfluoresceins  $10^{-5}$  M beträgt. Die Lösung wird in eine Druckmeßzelle gegeben. Nach Spülen mit  $N_2O$  werden 50 bar  $N_2O$  bei 37° C angelegt, gerührt und die optische Dichte bei 675 nm verfolgt. Zwischen 400 und 600 min tritt Lyse der Zellen ein, deutlich sichtbar durch den typisch sigmoiden Abfall der optischen Dichte. Referenzmessungen unter Atmosphärendruck oder 50 bar hydrostatischem Druck zeigen bis zu 18 Stunden keine Lyse der Erythrocyten. Die Lösungen werden langsam auf Atmosphärendruck entspannt und unter dem Mikroskop in Durchsicht und Fluoreszenz untersucht. Die Erythrocyten zeigen vor und nach Lyse das typisch discoide Aussehen. Nicht-lysierte Zellen (Kontrollen) enthalten im Gegensatz zu den zwischenzeitlich lysierten kein Carboxyfluorescein. Die Zellfluoreszenz ist auch nach extensivem Waschen unverändert sichtbar. Es ist damit offensichtlich, daß die Erythrocyten den Farbstoff im lysierten Zustand unter isotonen Bedingungen aufgenommen haben und während der Entscannung wieder versiegelt wurden.

Beispiel 4: Wie Beispiel 3, nur werden

Schaferythrocyten anstelle der Rindererythrocyten in 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 9 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 3 mM KCl, 137 mM NaCl, pH 7,5 verwendet. Die Lyse tritt zwischen 55 bis 70 min ein. Die Ergebnisse sind mit denen aus Beispiel 3 vergleichbar.

5

#### Patentansprüche

1) Verfahren zur Herstellung inhaltsstoffe-  
enthaltender Liposomen und/oder biologischer  
Zellen, dadurch gekennzeichnet, daß Liposo-  
men oder biologische Zellen in wäßrigem  
Medium mit Inertgasen, die mit steigendem  
Druck zu einer zunehmenden Abnahme der  
Lipidordnung führen, im gasförmigen oder  
flüssigen Zustand unter Zusatz der gewünsch-  
ten Inhaltsstoffe unter Druck behandelt werden  
und anschließend eine Druckentspannung auf  
Atmosphärendruck vorgenommen wird.

10

2) Verfahren nach Anspruch 1, dadurch  
gekennzeichnet, daß die von den Liposomen  
oder biologischen Zellen aufgenommenen In-  
haltsstoffe Pharmaka sind.

15

3) Verfahren nach Anspruch 1, dadurch  
gekennzeichnet, daß als Inertgas Lachgas  
(N<sub>2</sub>O), Halothan, Argon, Xenon, Schwefelhexa-  
fluorid (SF<sub>6</sub>), Alkane wie Methan, Ethan, Pro-

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

4

pan, Butan, Hexan, Heptan, Alkene wie Ethan,  
Propan, Buten, Hexen, Hepten und/oder deren  
Mischungen verwendet werden.

4) Verfahren nach Anspruch 1, dadurch  
gekennzeichnet, daß ein Druck bis zu 1000 bar,  
vorzugsweise bis zu 200 bar verwendet wird.

5) Verfahren nach Anspruch 1, dadurch  
gekennzeichnet, daß zur Druckentspannung  
die Liposomen suspension durch gräbenselekti-  
ve Filter gedrückt wird.

6) Verfahren nach Anspruch 1, dadurch  
gekennzeichnet, daß die Inhaltsstoffe inkorpo-  
riert, addiert und/oder substituiert werden.

7) Verfahren nach Anspruch 1, dadurch  
gekennzeichnet, daß die biologischen Zellen  
Zellen der Blutbahn wie Erythrocyten, Leucocy-  
ten, Lymphocyten und Thrombocyten sind.

8) Verfahren nach Anspruch 1, dadurch  
gekennzeichnet, daß die biologischen Zellen  
Zellen sind, die in Kultur gehalten werden und  
die pflanzlichen und/oder tierischen und/oder  
mikrobiellen Ursprungs sind.

9) Verwendung der nach Anspruch 1 herge-  
stellten Liposomen und/oder biologischen Zel-  
len als Vehikel für den Transport und/oder  
Speicherung von Pharmaka für diagnostische  
und/oder therapeutische Zwecke.



Europäisches  
Patentamt

EUROPÄISCHER RECHERCHENBERICHT

Nummer der Anmeldung

EP 89 73 0103

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE

Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der mitgebrachten Teile	Betrifft Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int. CL.4)
X	EP-A-0 069 307 (F. HOFFMANN-LA ROCHE & CO.) * Insgesamt *	1-3, 6, 9	A 61 K 9/50 A 61 K 47/00
V	---	4, 5	
Y	WC-A-3 600 238 (THE LIPOSOME CO., INC.) * Seite 14, Zeile 1 - Seite 15, Zeile 4; Seite 19, Zeile 11 - Seite 20, Zeile 24; Beispiele 1, 8 *	4, 5	
A	EP-A-0 055 576 (THE PROCTER & GAMBLE CO.) * Seite 4, Zeilen 6-23; Seite 6, Zeile 13 - Seite 8, Zeile 27; Seite 10, Zeile 8 - Seite 12, Zeile 6 *	1-9	
A	FR-A-2 373 289 (KERNFORSCHUNGSAVLAGE JÜLICH GmbH) * Seite 1, Zeile 1 - Seite 2, Zeile 18; Seite 5, Zeile 20 - Seite 7, Zeile 22 *	1-9	RECHERCHIERTE SACHTIGE BIEDE (Int. CL.4)
A	US-A-4 327 710 (J.R. DELOACH) * Spalte 1, Zeile 10 - Spalte 2, Zeile 35; Anspruch 1 *	1-9	A 61 K

Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt

Recherchenamt	Abschlußdatum der Recherche	Prüfer
DEN HAAG	20-07-1989	MUELLNERS W.
KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE		
A : von besonderer Bedeutung allein betrachtet	T : der Erfindung zugrunde liegende Theorie oder Grundsätze	
V : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie	E : älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmelddatum veröffentlicht wurde	
A : technologischer Hintergrund	D : in der Anmeldung angeführtes Dokument	
O : ausländische Offenlegung	L : aus anderen Gründen angeführtes Dokument	
P : Zusatzliteratur	S : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument	

THIS PAGE BLANK (USP10)

PARTIAL TRANSLATION:

(19) European Patent Office

(11) Document No.: 338,971 A1

(12)

EUROPEAN PATENT APPLICATION

(21) Application No.: 89-730,103.2

(51) Int. Cl. 4: A 61 K 9/50  
A 61 K 47/00

(22) Filing Date of Application:

April 13, 1989

---

(30) Convention Priority Data:

April 16, 1988; FRG; No. 3,812,816

(43) Publication Date Of  
Unexamined Document No  
Which No Grant Has  
Taken Place:

October 25, 1989; Patentblatt 89/43

(84) Treaty Nations Cited:

AT, BE, CH, DE, ES, FR, GB, GR, IT,  
LI, LU, NL, and SE

(71) Applicant:

Schering Aktiengesellschaft, Berlin  
and Bergkamen  
Müllerstrasse 170/178  
Postfach 65 03 11  
1000 Berlin 65, FRG

(72) Inventor:

Lawaczeck, Rüdiger, Ph.D.  
Beyschlagstrasse 8c  
1000 Berlin 27, FRG

---

(54) Title of the Invention:

PROCESS FOR THE PRODUCTION OF LIPOSOMES AND/OR BIOLOGICAL CELLS  
CONTAINING SUBSTANCES ENCLOSED WITHIN THEM AND THEIR USE

(57) Abstract:

For the incorporation into, addition to, and/or substitution of substances in liposomes or cells, sufficiently pressurized inert gases, which lead with increasing pressure to a decrease in the state of order of the lipids, are used in the gaseous and/or liquefied state. The loaded liposomes or cells are suitable as carriers of pharmaceutical agents.

THIS PAGE BLANK (USPTO)